

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82674

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07486

研究課題名(和文) プロテノパチー発症機序解明のためのHDAC6選択的PETプローブの開発

研究課題名(英文) Development of HDAC6 PET imaging probes for proteinopathies

研究代表者

多胡 哲郎 (Tago, Tetsuro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50780649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンデアセチラーゼ6(HDAC6)は細胞質内のタンパク質の脱アセチル化を担う酵素であるが、近年の病理学的な研究から、タンパク質の異常凝集を特徴とする神経変性疾患(プロテノパチー)の発症に関与していることが示唆された。本研究ではプロテノパチー研究のための、陽電子断層撮像装置(PET)用HDAC6イメージングプローブの開発を目的とした。結果、2種類の放射性同位元素標識プローブを合成できた。一方で生物学的評価の結果から、これら化合物は脳内移行性が低いことが明らかとなり、血液脳関門透過性を改善する構造最適化の必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylases (HDACs) are enzymes responsible for lysine deacetylation of histones. In particular, HDAC6 is a unique enzyme that is mainly found in the cytosol and regulates deacetylation of cytosolic proteins including  $\alpha$ -tubulin and tau protein. HDAC6 has been implicated in neurodegeneration with abnormal protein accumulation in the brain. Thus, research into the role of HDAC6 with in vivo imaging will facilitate development of drugs targeting HDAC6. Our goal was to develop radiolabeled probes for positron emission tomography (PET) imaging of HDAC6. Two radiolabeled Tubastatin A derivatives were successfully synthesized. However, biological evaluations suggested that brain uptake of these probes were poor. Structural optimization which improves the blood-brain barrier permeability is needed.

研究分野：放射性医薬品科学

キーワード：PET HDAC6 分子イメージング プロテノパチー 核医学 放射性医薬品

## 1. 研究開始当初の背景

認知機能障害や運動障害を呈する神経変性疾患の分類は多様であるが、その多くで脳内におけるタンパク質凝集体の異常集積が認められる。そのような疾患はプロテオパチーと総称され、例えばアルツハイマー病ではアミロイドとタウタンパク質、パーキンソン病ではシヌクレイン、筋萎縮性側索硬化症ではTDP-43などがそれぞれ蓄積し、各疾患を病理学的に特徴づけている。タンパク質病変は臨床症状が現れる前から蓄積し始めることが知られており、従って蓄積を非侵襲的に検出できる技術は、各疾患の研究や診断に応用できると言える。

このような観点から陽電子断層撮像法 (positron emission tomography: PET) と放射性プローブを使用し、タンパク質病変をイメージしようとする研究が盛んに展開されてきた。現状としては、十年以上前から開発が進んでいるアルツハイマー病のアミロイドやタウのプローブについては多くの臨床研究が行われている一方で、シヌクレインのイメージングプローブ開発は遅れている。

当研究グループはシヌクレイン病変をイメージングするための標的として、ヒストンデアセチラーゼ6 (histone deacetylase 6: HDAC6) に着目した。HDAC6は染色体を構成するヒストンの脱アセチル化を担う酵素ファミリーの一員ではあるが、主に細胞質に局在し、 $\alpha$ -チューブリンやタウタンパク質をその基質としている。またHDAC6の特徴として、ユビキチン結合ドメインを有しており、ユビキチン化されたタンパク質を分解が行われるアグリソームに移送する機能も有している。近年の病理学的な研究からHDAC6はユビキチン陽性であるシヌクレイン病変と共局在することが明らかとなっており、従ってHDAC6プローブは、間接的なシヌクレイン病変のイメージングに使用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではPET用HDAC6イメージングプローブの開発を目的とする。HDAC6プローブはシヌクレイン病変の間接的なイメージングに使用できる可能性があり、将来的なプロテオパチー研究への応用が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 候補化合物と標識前駆体の合成

本研究ではHDAC6プローブの基本骨格として、Butlerらが報告したHDAC6選択的阻害剤であるツバスタチンAを選択した。ツバ

スタチンAはヒドロキサム酸を有するカルボリン類縁体であり、HDAC6に対する親和性はIC<sub>50</sub>値で15 nMであり、他のHDACに対するIC<sub>50</sub>値は850 nM以上である(Butler et al., J Am Chem Soc, 2010;132:10842)。放射性核種標識誘導体としては、炭素11標識体 (<sup>11</sup>C)**1**)とフッ素18標識体 (<sup>18</sup>F)**2**)の2種類を設計した。炭素11標識体はピリジン窒素にメチル基を導入し、標識前駆体としては脱メチル化体を合成した。フッ素18標識体は同位置にフルオロエチル基を導入し、標識前駆体としてはトシル化体を合成した。

### (2) 放射性標識合成

<sup>11</sup>C)**1**は脱メチル化前駆体を、DMSO中で<sup>11</sup>CH<sub>3</sub>Iまたは<sup>11</sup>CH<sub>3</sub>OTfと反応させることで標識合成した(図1)。フッ素18の放射性半減期は炭素11に比べて長く、標識合成にかかる時間を比較的長くとることが出来る。そこで<sup>18</sup>F)**2**の標識合成は、フッ素化とヒドロキサム酸化から構成されるワンポット二段階反応により行うこととした(図2)。まずトシル化前駆体をアセトニトリル中、<sup>18</sup>F]TBAFと90で15分間反応させ、<sup>18</sup>F-フッ素化した。続いて溶媒を加熱により乾固し、反応容器を室温に冷却してから50% NH<sub>2</sub>OH水溶液と2 N NaOHメタノール溶液を添加し、同温で10分間攪拌してヒドロキサム酸化を行った。目的物は分取HPLCを使用して精製した。目的物を含むフラクションは移動相を減圧留去し、生理食塩水に再溶解させることで続く生物学的評価に使用した。

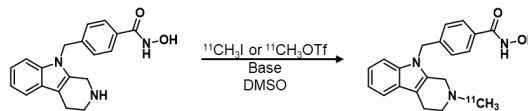


図1. <sup>11</sup>C)**1** 標識合成

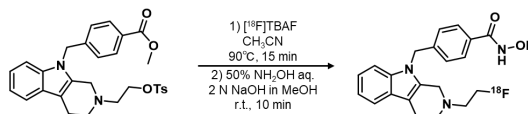


図2. <sup>18</sup>F)**2** 標識合成

### (3) HDAC 結合性評価

合成した化合物1と2のHDAC結合性については、酵素活性測定キットを使用し、IC<sub>50</sub>値を求めることで評価した。

### (4) マウスにおける体内分布試験

体内分布試験ではマウス (ddY、雄、8週齢) に標識体生理食塩水溶液 (<sup>11</sup>C)**1**: 4.7 MBq; <sup>18</sup>F)**2**: 0.8 MBq) を尾静脈投与し、投与後60分までの各タイムポイントで頸椎脱臼により安楽死させ、脳や血液、肝臓などの組織を採取した。各組織については放射能と重量を測定し、%投与量/組織重量 (%ID/g) を算出した。

#### (5) マウスにおける代謝解析試験

マウスに $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ 生理食塩水溶液(37 MBq)を尾静脈投与し、投与15分後と30分後に頸椎脱臼により安楽死させ、血液を採取した。血漿を調製後、アセトニトリルによる抽出を行い、HPLCを使用して放射性の未変化体や代謝物の存在比率を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 放射性標識合成

$[^{11}\text{C}]\mathbf{1}$ の標識合成について、反応条件としてまずは先行研究(Lu et al., J Labelled Comp Radiopharm, 2013;56:S319)に則り、水酸化カリウム存在下、 $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ と80で5分間反応させた。目的物を分取HPLCにより精製した結果、放射化学的収率は14%(減衰補正後、反応バイアルにトラップされた放射能を基準とした)であった( $n=2$ )。同様な加熱条件下、 $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ を使用したところ、 $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ を使用した場合と同程度の放射化学的収率(11%)で $[^{11}\text{C}]\mathbf{1}$ が得られた( $n=2$ )。一方で $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ を使用し、加熱反応なしで $^{11}\text{C}$ -メチル化反応を行ったところ、加熱条件下と同程度の放射化学的収率(16%,  $n=3$ )が得られることが明らかとなった。

$[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ の標識合成について、使用した $[^{18}\text{F}]\text{TBAF}$ を基準とした放射化学的収率は17%(減衰補正後,  $n=4$ )であった。

#### (2) HDAC 結合性評価

HDAC6活性に対する $\mathbf{1}$ と $\mathbf{2}$ の $\text{IC}_{50}$ 値はそれぞれ30.4 nM, 33.1 nMであったのに対し、HDACファミリーの代表例であるHDAC1に対してはそれぞれ904 nM, 996 nMであった(図3)。結果として先述のKalinらによる先行研究と同様に、 $\mathbf{1}$ と $\mathbf{2}$ はHDAC6に対して高い選択性を維持していることが示唆された。

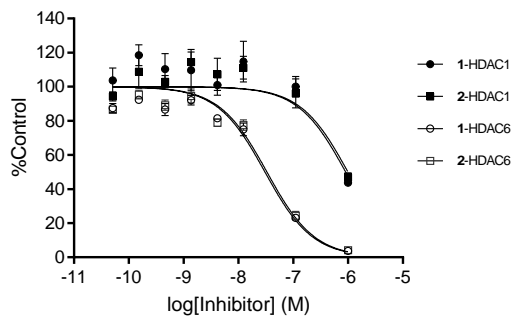


図3. HDAC活性阻害曲線

#### (3) マウスにおける体内分布試験

体内分布試験の結果、両化合物とも同様な体内動態を示した(図4)。代謝臓器における動態について、肝臓、腎臓では投与直後に高い取り込み量を示し、その後時間とともに排出されたことから、各標識体は胆汁排泄と腎排泄の両経路により排泄されることが示唆

された。 $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ を投与したマウスでは、骨における放射能集積の増加は認められなかったことから、 $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ は生体内脱フッ素代謝を受けにくいことが示唆された。一方脳内動態に関して、脳内取り込み量は投与後60分間を通して1% ID/g以下であったことから、いずれの標識体も血液脳関門透過性に乏しいということが明らかとなった。

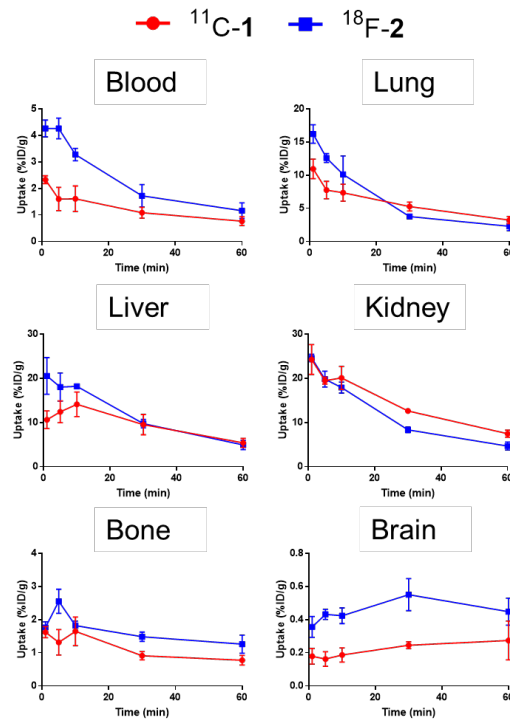


図4. マウスの主要臓器における時間放射能曲線

#### (4) マウスにおける代謝解析試験

$[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ については、マウスの血漿中における代謝安定性を評価した。血漿中の全放射能に対する未変化体由来の放射能の比率を算出した結果、投与後15分後では $76 \pm 3\%$ 、投与後30分後では $70 \pm 12\%$ であった。放射性代謝物として、未変化体よりも高極性な代謝物が2種類認められた(図5)。

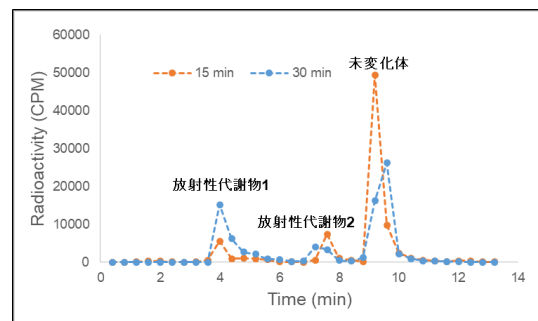


図5.  $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ の血漿中放射性代謝物のHPLC解析結果

#### (5) 総括

本研究により、2種類の放射性標識HDAC6プローブの候補を合成することが出来た。合

成した化合物の生物学的評価の結果、HDAC 選択性や代謝安定性については良好な結果が得られたが、脳内移行性が低いことが課題として明らかとなった。本研究の最終的な目標である脳内 HDAC6 イメージングの実現に向けて、今後は構造最適化により血液脳関門透過性を向上させたプローブの開発に取り組みたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計5件)

Tetsuro Tago, Jun Toyohara. Advances in the Development of PET Ligands Targeting Histone Deacetylases for the Assessment of Neurodegenerative Diseases, *Molecules*, 2018;23:E300. 査読あり、doi: 10.3390/molecules23020300  
Mikio Hiura, Tadashi Nariai, Muneyuki Sakata, Akitaka Muta, Kenji Ishibashi, Kei Wagatsuma, Tetsuro Tago, Jun Toyohara, Kenji Ishii, Taketoshi Maehara. Response of Cerebral Blood Flow and Blood Pressure to Dynamic Exercise: A Study Using PET, *International Journal of Sports Medicine*, 2018;39:181-188. 査読あり、doi: 10.1055/s-0043-123647  
Ryuichi Harada, Aiko Ishiki, Hideaki Kai, Naomi Sato, Katsutoshi Furukawa, Shozo Furumoto, Tetsuro Tago, Naoki Tomita, Shoichi Watanuki, Kotaro Hiraoka, Yoichi Ishikawa, Yoshihito Funaki, Tadaho Nakamura, Takeo Yoshikawa, Ren Iwata, Manabu Tashiro, Hironobu Sasano, Tetsuyuki Kitamoto, Kazuhiko Yanai, Hiroyuki Arai, Yukitsuka Kudo, Nobuyuki Okamura. Correlations of 18F-THK5351 PET with post-mortem burden of tau and astrogliosis in Alzheimer's disease, *Journal of Nuclear Medicine*, 2018;59:671-674. 査読あり、doi: 10.2967/jnumed.117.197426  
Kenji Ishibashi, Masashi Kameyama, Tetsuro Tago, Jun Toyohara, Kenji Ishii. Potential use of 18F-THK5351 PET to image Wallerian degeneration of pyramidal tract caused by cerebral infarction, *Clinical Nuclear Medicine*, 2017;42:e523-e524. 査読あり、doi: 10.1097/RLU.0000000000001868  
多胡哲郎、豊原潤、酒井昌成、林薫平、石井賢二. ヒストンデアセチラーゼ6のイメージングを目的とした PET プロー

ブの開発、*JSMI Report*, 2017;11:25-28. 査読あり、[http://www.molecularimaging.jp/journal2/journal\\_detail.asp?journal\\_id=2836](http://www.molecularimaging.jp/journal2/journal_detail.asp?journal_id=2836)

##### [学会発表](計5件)

多胡哲郎、豊原潤、酒井昌成、林薫平、石井賢二. ヒストンデアセチラーゼ6のPET イメージングを目的とした放射性標識ツバスタチン A 誘導体の開発、第57回日本核医学会学術総会、2017.10.5-7、横浜  
Tetsuro Tago, Kunpei Hayashi, Masanari Sakai, Kenji Ishii, Jun Toyohara. Development of PET probes for imaging of histone deacetylase 6, *FASMI 2017*, 2017.8.25-26, Seoul, The Republic of Korea.  
多胡哲郎、林薫平、酒井昌成、石井賢二、豊原潤. Development of PET probes for imaging of histone deacetylase 6、第12回日本分子イメージング学会学術集会、2017.5.25-26、横浜  
Tetsuro Tago, Kunpei Hayashi, Masanari Sakai, Kenji Ishii, Jun Toyohara. Radiosynthesis of carbon-11- and fluorine-18-labeled Tubastatin A derivatives for PET imaging of histone deacetylase 6. 22nd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 2017.5.14-19, Dresden, Germany.  
多胡哲郎. コンフォメーション病のイメージングを目的とした PET プローブ開発、首都大バイオコンファレンス2016、2016年11月18日、八王子

##### [図書]

該当なし

##### [産業財産権]

##### 出願状況

該当なし

##### 取得状況

該当なし

##### [その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

多胡 哲郎 (TAGO, Tetsuro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50780649